



TITLE:

亜鉛フィンガー型転写因子Sp1によるDNA認識とその機能変換に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

永岡, 真

CITATION:

永岡, 真. 亜鉛フィンガー型転写因子Sp1によるDNA認識とその機能変換に関する研究. 京都大学, 1997, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/202485>

RIGHT:

氏 名	なが 永 おか 岡 まこと 真
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 384 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	亜鉛フィンガー型転写因子 Sp1 による DNA 認識とその機能変換に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 浦 幸 雄	教 授 藤 井 信 孝	教 授 伊 藤 信 行
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

亜鉛は鉄に次いで生体内含有量の多い金属であり、種々の生体反応において重要な役割を果たしている。近年、亜鉛の新たな役割として遺伝子の転写への関与が明らかになってきた。これは亜鉛フィンガーと呼ばれ、DNA 結合がタンパク質中の金属結合ドメインを通して行われ、そして亜鉛を結合させる配位子により C_2H_2 型、 C_4 型、 C_3H 型に大別される。中でも C_2H_2 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識は、(1)亜鉛が構造因子として働き、亜鉛の結合により DNA 結合能が決定される、(2)数個の亜鉛フィンガーが一定間隔で直列につながっており、その個々の亜鉛フィンガーの認識する塩基配列はほぼ3塩基で一定となっている、(3)亜鉛フィンガーを有するタンパク質は単量体で DNA に結合する、などの特徴をもっている。 C_2H_2 型亜鉛フィンガーは、TFIIIA、Sp1 などの真核細胞の転写因子に見られ、その DNA 結合部位として機能するため、亜鉛フィンガーによる DNA 認識様式の分子レベルでの解明は、転写機能の発現制御機構の理解に極めて重要である。また、これらの基礎的知見を基に、任意の塩基配列を認識する亜鉛フィンガータンパク質を創製することは、人工制限酵素や人工リプレッサーの開発に有効なものとなり得る。本研究では、3つの C_2H_2 型亜鉛フィンガーを有するヒト由来の転写因子 Sp1 を用いて、その DNA 認識と機能変換について分子生物学的並びに生化学的手法を駆使して追究し、以下のような幾つかの興味ある知見を得た。

第1章 Sp1 による DNA 認識における金属置換の影響

亜鉛フィンガーによる DNA 結合は、亜鉛の結合による高次構造形成が前提となり、この高次構造形成がその特異な塩基認識様式をもたらす。従って、異種金属による高次構造形成は、DNA 塩基の認識に何らかの影響を及ぼすことが予測される。そこで、亜鉛フィンガー領域の亜鉛 (II) を、カドミウム (II) およびニッケル (II) で置換した2種の金属置換体 Cd (II) Sp1 および Ni (II) Sp1 を調製し、それらの GC ボックス結合特異性について、種々の塩基配列をもつオリゴマーを合成して、ゲルシフト法により検討した。その結果、Cd (II) Sp1 は Zn (II) Sp1 と同様の塩基配列優先性を示したが、他方 Ni (II) Sp1

は明確に異なった塩基配列優先性を示した。これは、ニッケル (II) のイオン半径及び錯体構造の歪みに由来した金属フィンガー部位の立体構造の微妙な相違に起因するものと考えられた。

第2章 Sp1 による DNA 認識におけるバックボーンリン酸との結合の影響

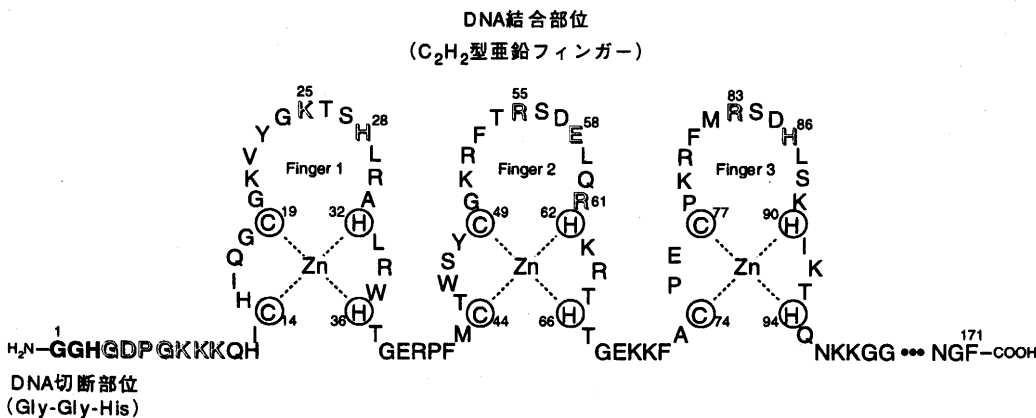
—各亜鉛フィンガーの独立性—

タンパク質による DNA 認識は、主として核酸塩基の認識とリン酸バックボーンの認識から成る。バックボーンリン酸との結合は、タンパク質と DNA との立体的な位置関係を決定するうえで重要であり、両者の相互作用にとって不可欠な要素である。C₂H₂ 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識に関するこれまでの研究は、DNA 塩基との結合に関するものが中心となっている。そこで、本研究では亜鉛フィンガー中において、DNA のリン酸と結合している Sp1 のアミノ酸残基に変異を導入した5種の変異体を調製し、それらの塩基配列特異性について追究した。その結果、1つの亜鉛フィンガー内での変異が、他の亜鉛フィンガーの塩基配列特異性に影響を及ぼすことが判明した。更にゲルシフト法やフットプリント法による詳細な解析の結果、この現象はリン酸との結合により引き起こされていた DNA の局所的な構造変化が、変異により失われたことが原因であると考えられた。これにより、構造的には互いに独立している各亜鉛フィンガーが、機能的には依存し合っていることが明確に示された。

第3章 亜鉛フィンガータンパク質の機能変換

—人工制限酵素の分子デザイン—

天然制限酵素は、通常、DNA における 4-8 塩基対の回文配列を認識し切断する。そのため、15-20塩基対程度の長さの任意の塩基配列を認識できる人工制限酵素の開発が望まれている。従来、DNA 結所タンパク質や3本鎖 DNA の形成を利用した人工制限酵素がデザインされてきたが、実用化されるまでには至っていない。その原因として、回文配列やホモプリン-ホモピリミジン配列など、認識配列が大きく限定されていたことが挙げられる。これに対し、C₂H₂ 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識様式は、単量体での結合やモジュール構造による DNA 認識といった特徴を有しており、新しい人工制限酵素の基本構造となり得ることが考えられる。



そこで、Sp1 の 3 つの C_2H_2 型亜鉛フィンガーのアミノ末端側に、DNA 切断部位 Gly-Gly-His を導入した DNA 切断分子 Sp1GGH を構築した。トリペプチド Gly-Gly-His (GGH) は銅 (II) 又はニッケル (II) と結合し、酸化剤存在下、DNA を酸化的に切断することが期待される。実際、Sp1GGH により DNA は Sp1 の結合部位近傍の 1 カ所で特異的に切断された。これにより、 C_2H_2 型亜鉛フィンガーが人工制限酵素の基本構造となり得ることが示された。

以上のように、 C_2H_2 型亜鉛フィンガーによる DNA 認識は、認識に関わるアミノ酸残基のみに変異をかけることにより、任意の塩基配列を認識することが可能になるといった単純なものではなく、結合する金属の種類や隣接するフィンガーの影響をも考慮しなければならないことがわかった。本研究で得られた知見は、亜鉛フィンガーによる核酸認識の分子理解に価値あるばかりでなく、人工制限酵素や転写制御物質の開発などにも有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、生体における亜鉛の新たな役割として、遺伝子の転写への関与が明らかになってきた。これは亜鉛フィンガーと呼ばれ、DNA 結合がタンパク質中の亜鉛結合ドメインを通して行われる。 C_2H_2 型亜鉛フィンガーは、真核細胞の転写因子などに見られ、その DNA 結合部位として機能するため、亜鉛フィンガーによる DNA 塩基認識様式の解明は、遺伝子転写機能の発現制御機構の分子レベルでの理解に極めて重要である。本研究では、3 個の C_2H_2 型亜鉛フィンガーを有するヒト由来の転写因子 Sp1 を実験材料に用いて、その DNA 塩基認識と人工制限酵素への機能変換について検討し、以下のような極めて興味のある知見を得た。

亜鉛フィンガードメインの亜鉛 (II) をカドミウム (II) またはニッケル (II) で置換した 2 種の金属置換体 Cd (II) Sp1 および Ni (II) Sp1 を作製し、それらの DNA 結合に対する塩基配列特異性を追究した結果、Cd (II) Sp1 は Zn (II) Sp1 と同様の塩基配列優先性を示したが、一方、Ni (II) Sp1 は明確に異なった塩基配列優先性を与えた。Ni (II) Sp1 の DNA 塩基配列特異性の違いは、ニッケル (II) イオンのイオン半径や錯体構造の歪みに由来した金属フィンガー部位の立体構造の微妙な相違に起因するものと推定された。

亜鉛フィンガーの DNA 結合における DNA りん酸バックボーン骨格の重要性を明らかにするため、Sp1 のアミノ酸残基に変異を導入した 5 種の変異体 Sp1 を調製し、それらの塩基配列特異性についてメチル化干渉法によって追究した。その結果、1 つの亜鉛フィンガー内での変異が他の亜鉛フィンガーの塩基配列特異性に影響を及ぼすことが判明した。さらにゲルシフト法やフットプリント法による詳細な解析の結果、この現象はりん酸骨格との結合によって引き起こされていた DNA の局所的な構造変化がアミノ酸変異によって消失したことが原因であると考えられた。この事実は、構造的には互いに独立している各亜鉛フィンガーが機能的には依存し合っていることを示唆している。

亜鉛フィンガータンパク質に制限酵素様機能を賦与するため、Sp1 の 3 個の C_2H_2 型亜鉛フィンガーのアミノ末端側に DNA 切断部位としてトリペプチド Gly · Gly · His (GGH) を導入した DNA 切断分子 Sp1GGH を構築した。GGH 部に Ni (II) を配位させ、酸化剤存在下、Sp1GGH による DNA 切断を試

みたところ、DNA は GC ボックス近傍の 1 カ所で特異的に切断された。切断パターンから、Sp1 と DNA との相対的位置関係は G 鎖の 5' 側に Sp1 のカルボキシル末端がくる逆平行型であることがわかった。これにより、亜鉛フィンガーが人工制限酵素の基本構造となり得ることが示された。

以上、本研究で得られた知見は亜鉛フィンガーによる DNA 認識の分子理解に価値あるばかりでなく、人工制限酵素や人工リプレッサーの開発などにも有用であると考えられる。よって、審査に当たった藤井教授、伊藤教授そして私は、本論文が博士（薬学）の論文として価値あるものと認めた。さらに、平成 9 年 1 月 17 日論文内容とそれに関連した事項につき口頭試問を行った結果、合格と認めた。